



TITLE:

Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yamamoto, Yuta

CITATION:

Yamamoto, Yuta. Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20673>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	山本 雄大
論文題目	Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation （カルモジュリン遺伝子関連 QT 延長症候群患者由来 iPS 細胞モデルにおける変異アレル特異的ノックアウトによる新規治療法の開発）		
（論文内容の要旨） 先天性 QT 延長症候群（long-QT syndrome: LQTS）は、心電図上の QT 間隔延長を特徴とし、心室性不整脈による失神や突然死を引き起こす致死性遺伝性不整脈疾患である。カルモジュリンはユビキタスに発現しているカルシウム検知タンパクであり、異なる 3 つの遺伝子（ <i>CALM1-3</i> ）が同一のアミノ酸配列のカルモジュリンタンパクをコードしている。カルモジュリンは複数のイオンチャネルを含め様々なタンパクを制御しており、特に Ca^{2+} と結合したカルモジュリンは心臓 L 型 Ca^{2+} チャンネル（LTCC）の不活性化を促進する重要な働きをしている。近年、 <i>CALM</i> 遺伝子のヘテロミスセンス変異が重症 LQTS やカテコラミン誘発性多形性心室頻拍などの重症不整脈の発生に関連していることが報告された。これらの症例では、変異アレルを除く 5 つのアレルからは正常なカルモジュリンが発現しているにもかかわらず疾患を引き起こすことから、機序として変異カルモジュリンによるドミナントネガティブ効果が示唆される。しかしながら、ヒト心筋細胞における <i>CALM</i> 遺伝子関連 LQTS（ <i>CALM</i> -LQT）の詳細な発症メカニズムは不明である。 本研究では、患者由来 iPS 細胞を用いた <i>CALM</i> -LQT の疾患モデル確立と遺伝子治療につながる新たなアプローチとしてゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウトを行った。 <i>CALM2</i> 遺伝子にヘテロミスセンス変異 N98S が同定された LQTS の 12 歳男児より iPS 細胞を作製（LQT-iPSC）した。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて変異アレル特異的ノックアウト iPSC クローン（LQT-KO-iPSC）を作製し、分化心筋の解析を行った。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行ったところ、LQT-iPSC-CM では Control-iPSC-CM と比較して活動電位持続時間（APD）が有意に延長しており（APD ₉₀ : LQT: 790.6 ± 101.0 ms, Control: 276.3 ± 24.5 ms; P < 0.01）、LQT-KO-iPSC-CM では Control と同程度まで改善された（APD ₉₀ : LQT-KO: 326.1 ± 28.6 ms）。また、LTCC 電流記録において LQT-iPSC-CM では LTCC 不活性化遅延が認められた。また、LQT-KO-iPSC-CMs では LTCC の不活性化遅延は改善しており、APD 延長の改善と合致する所見であった。 本研究では、 <i>CALM</i> -LQT 患者由来 iPS 細胞を用いて、LTCC 不活性化遅延による APD 延長という発症メカニズムを明らかにした。しかしながら、カルモジュリンは LTCC 以外にも多くのタンパクを制御しており、今後、さらなる詳細な解析が必要である。また、CRISPR/Cas9 システムを用いた変異アレル特異的なノックアウトにより LQT-iPSC-CMs の APD 延長や LTCC 不活性化遅延といった電気生理学的な異常を改善することが出来た。これらの結果は、ヒト心筋細胞において <i>CALM</i> -LQT は変異カルモジュリンのドミナントネガティブ効果により引き起こされることを示す重要なデータである。さらに、ゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウトは同様			

なドミナントネガティブ効果によって引き起こされる他の遺伝性疾患の治療にも応用が考えられる。遺伝子治療には安全性や効率などの課題があるが、将来の臨床応用に向けた新たな知見になり得ると考えられた。			
(論文審査の結果の要旨)			
カルモジュリンは、ユビキタスに発現する Ca ²⁺ 検知タンパクであり、3 つの異なる遺伝子 (<i>CALM1-3</i>) が同じアミノ酸配列を持つ同一の蛋白をコードする。近年、カルモジュリンのヘテロミスセンス変異が致死性不整脈疾患である遺伝性 QT 延長症候群 (LQT) を引き起こすことが報告された。			
本研究では、 <i>CALM</i> 遺伝子関連 LQT のヒト iPS 細胞 (hiPSC) モデル確立と、作製した疾患モデルにおいて、最新のゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウトによる遺伝子治療の試みを行った。ヘテロ <i>CALM2</i> -N98S 変異を持つ LQT15 患者より hiPSC を樹立し、分化心筋の解析を行ったところ、コントロールと比較して、有意な活動電位持続時間の延長、L 型 Ca ²⁺ チャネル電流の不活性化遅延が認められ、疾患表現型を再現していると考えられた。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いた変異アレル特異的ノックアウトクローンでは、上記の電気生理学的異常の改善が認められ、LQT15 の発症機序に変異カルモジュリン蛋白による dominant negative 効果が関与していることが示唆された。			
以上の研究は、ヒト心筋細胞における <i>CALM</i> 遺伝子関連 LQT の病態解明に貢献し、ゲノム編集技術を用いた変異アレル特異的ノックアウト法は、dominant negative 効果を機序とする遺伝性疾患の新規治療法の開発に寄与し得ると考えられる。			
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。			
なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 9 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			